



1.569.499

## BREVET D'INVENTION

- (21) N° du procès verbal de dépôt ..... 156.453 - Paris.  
(22) Date de dépôt ..... 25 juin 1968, à 15 h 17 mn.  
Date de l'arrêté de délivrance ..... 21 avril 1969.  
(46) Date de publication de l'abrégé descriptif au  
*Bulletin Officiel de la Propriété Industrielle*. 30 mai 1969 (n° 22).  
(51) Classification internationale ..... C 13 k.

(54) **Procédé pour la production de maltose de grande pureté.**

(72) Invention :

(71) Déposant : HAYASHIBARA COMPANY, résidant au Japon.

Mandataire : Armand Kohn, 5, avenue Foch, 92-Garches.

(30) Priorité conventionnelle :

(32) (33) (31) *Brevet déposé au Japon le 30 juin 1967, n° 41.581/1967 au nom de la demanderesse.*

La présente invention concerne un procédé pour la production de solutions de maltose de grande pureté, par liquéfaction de l'amidon, puis saccharification de celui-ci au moyen d'amylase.

Il était d'usage, précédemment, pour la production du maltose, 5 de liquéfier l'amidon, par exemple au moyen de la  $\beta$ -amylase, et puis d'ajouter du malt au liquide obtenu, afin de réaliser la saccharification par l'action de l'amylase du malt (c'est-à-dire un mélange des amylases  $\alpha$  et  $\beta$ ). Dans ce procédé de production du maltose par le malt, on obtenait une solution saccharifiée contenant au maximum environ 70% de 10 maltose pur, même si la teneur en  $\beta$ -amylase était accrue par le choix d'un malt renfermant une assez grande quantité de  $\beta$ -amylase.

Le raffinage de ces solutions saccharifiées est très difficile, et comme on ne peut utiliser la purification par recristallisation, il est d'usage pratiquement de raffiner ces produits par précipitation 15 fractionnée à l'alcool, ou bien par recristallisation de leurs dérivés. Cependant, même le maltose que l'on peut se procurer dans le commerce sous la désignation de qualité spéciale, ne peut atteindre un degré de pureté supérieur à 93% environ, et il contient des dextrines, du malt-triose, du glucose et d'autres impuretés.

20 C'est pourquoi la demanderesse a recherché plus particulièrement un procédé pour la production de solutions de maltose de grande pureté, par saccharification de l'amidon liquéfié, au moyen de la  $\beta$ -amylase. Le nouveau procédé selon l'invention consiste à ajouter, au cours de la saccharification avec la  $\beta$ -amylase, de l' $\alpha$ -1,6-glucosidase 25 qui est un enzyme capable d'agir spécifiquement, en scindant les liaisons  $\alpha$ -1,6-glucosidiques de l'amylopectine de l'amidon, et donner une solution de maltose de grande pureté.

On peut se rendre compte de l'avantage du nouveau procédé par la comparaison des exemples (A) et (B) ci-après.

30 (A) - On liquéfie une bouillie à 10% d'amidon de patate douce, jusqu'à obtention d'un E.D. (équivalent de dextrose) de 2,7%, avec de l' $\alpha$ -amylase, et l'on saccharifie le produit résultant par addition de 25 unités de  $\beta$ -amylase par gramme d'amidon à 45°C pendant 16 heures.

(B) - Dans les mêmes conditions, on ajoute 25 unités de  $\beta$ -amylase 35 et 10 unités de pullulanase ( $\alpha$ -1,6-glucosidase) par gramme d'amidon pour la saccharification.

Les compositions des solutions saccharifiées, ainsi obtenues, sont indiquées au Tableau I. On constate que, lorsque l'amylase est utilisée seule, la teneur en maltose de la solution saccharifiée (A) est 40 de 69,6 %, tandis que celle de la solution (B) obtenue par l'action combinée de la  $\beta$ -amylase et de la pullulanase dépasse 90%.

T A B L E A U I

	% Maltose	% glucose	% malt-triose	% dextrose
(A)	69,6	1,1	3,5	25,7
45 (B)	90,4	0,4	1,3	7,9

La pullulanase employée, qui est une  $\alpha$ -1,6-glucosidase (isoamylase), capable de scinder spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -1,6-glucosidiques, peut être obtenue par des cultures de bactéries *Aerobacter aerogenes*.

L'activité de l' $\alpha$ -1,6-glucosidase est déterminée comme suit. On  
 5 porte à 40°C pendant 30 minutes, la solution réactionnelle composée de  
 solution d'enzyme ..... 1 ml  
 solution d'amidon de riz glutineux à 1% ..... 5 ml  
 solution tampon d'acide acétique 0,5 M, pH 6 ..... 1 ml

On ajoute à 15 ml d'eau 0,5 ml du produit obtenu et 0,5 ml d'une solu-  
 10 tion d'iode 0,01 M. Au bout de 15 minutes, on détermine la capacité d'  
 absorption à une longueur d'onde de 610 m $\mu$  et l'on estime à 10 unités  
 l'activité enzymatique correspondant à un changement de 0,1 de cette ca-  
 pacité d'absorption.

Méthode de détermination de l'activité de la  $\beta$ -amylase :  
 15 On fait réagir à 40°C pendant 30 minutes une solution comprenant  
 solution d'amidon soluble à 1% ..... 5 ml  
 solution tampon d'acide acétique M/10 ..... 4 ml  
 solution d'enzyme ..... 1 ml

Le sucre réducteur ainsi obtenu est exprimé en glucose. Lorsqu'il  
 20 contient 10 mg de maltose, l'activité enzymatique est évaluée à 1 u-  
 nité.

Ainsi qu'il est indiqué ci-dessus, l'addition d' $\alpha$ -1,6-glucosidi-  
 dase à l'amidon liquéfié en cours de saccharification par la  $\beta$ -amylase,  
 pour la production de maltose, permet le clivage de la liaison  $\alpha$ -1,6-  
 25 glucosidique au point de ramification de l'amylopectine de l'amidon et  
 la formation d'une structure en chaîne longue, comme celle de l'amylose,  
 qui est facilement décomposée par la  $\beta$ -amylase. Il apparaît ainsi, que  
 l'efficacité de la saccharification de l'amidon, liquéfié par la  $\beta$ -amy-  
 lase, est améliorée, sans qu'il subsiste une dextrine possédant une liai-  
 30 son  $\alpha$ -1,6-glucosidique et connue sous le nom de dextrine limitée  $\alpha$ ,  $\beta$  ;  
 d'autre part on empêche la production de produits secondaires, comme le  
 malt-triose et le glucose, en utilisant de l'amidon liquéfié à faible  
 E.D. Il est probable que ces facteurs concourent pour donner une solu-  
 tion de maltose de grande pureté.

35 Les  $\alpha$ -1,6-glucosidases ne comprennent pas uniquement la pullu-  
 lanase produite par les bactéries du genre *Aerobacter*, mentionnée ci-  
 dessus, mais également l'isoamylase obtenue par des bactéries du genre  
*Pseudomonas*, par exemple la variété obtenue par une culture de *Pseudo-*  
*monas amyloclavata*. L'expérimentation a montré que ce dernier enzyme,  
 40 combiné avec la  $\beta$ -amylase, peut donner une solution de maltose d'une  
 pureté aussi grande que celle à laquelle conduit un mélange de pullula-  
 nase et de  $\beta$ -amylase.

Il ressort de ce qui précède, qu'il est possible d'avoir, dans  
 le procédé de production de maltose par saccharification de l'amidon  
 45 liquéfié au moyen de  $\beta$ -amylase, une nette augmentation de la teneur en

maltose de la solution saccharifiée, par addition de  $\alpha$ -1,6-glucosidase. On a également constaté que l'addition supplémentaire d'un enzyme amylo-lytique ( $\alpha$ -amylase) au cours de la saccharification, facilite la purification de la solution saccharifiée.

- 5 Lorsque l'on purifie de manière habituelle une solution saccharifiée, obtenue par saccharification d'amidon liquéfié par la  $\beta$ -amylase et l' $\alpha$ -1,6-glucosidase, de très petites quantités de dextrans à haut poids moléculaire demeurent, et rendent la purification par résine échangeuse d'ions extrêmement difficile ; de fait le produit obtenu peut être
- 10 trouble. L'addition d' $\alpha$ -amylase facilite beaucoup la purification de la solution saccharifiée par une résine échangeuse d'ions. A titre d'illustration, on compare au point de vue de leur aptitude à être traitées avec une résine échangeuse d'ions, une solution (C) saccharifiée par l'utilisation combinée de  $\beta$ -amylase et de pullulanase (concentration de
- 15 la solution saccharifiée 39,4%), et une solution (D) saccharifiée par la combinaison de 3 agents de conversion, c'est-à-dire  $\beta$ -amylase, pullulanase et  $\alpha$ -amylase (concentration de la solution saccharifiée 39,4%). Les résultats sont indiqués dans le Tableau II. Ainsi qu'on peut le constater, (C) n'est presque pas purifiée par la résine, tandis que (D)
- 20 est aisément purifié.

TABLEAU II

	Traitement préalable sur 2 couches acide fort - base moyenne	Traitement en couches mix- tes acide fort - base forte
25 C	8 volumes de solution par volume de résine acide ; pH 5,2 ; resis. sp. $5 \times 10^4$ cm	2 vol. solution par vol. résine ; pH 3,7 ; resis. sp. $8 \times 10^3$ cm.
D	20 volumes de solution par vol. de résine acide ; pH 8 ; resis. sp. $10^5$ cm	40 vol. solution par vol. résine ; pH 5 ; resis. sp. $10^3$ cm.

- 30 Toujours selon la présente invention, d'autres études ont amené la demanderesse à constater que, l'utilisation d'un mélange de différentes variétés d' $\alpha$ -1,6-glucosidases, au lieu d'une seule variété, en combinaison avec la  $\beta$ -amylase, permet d'accroître le rendement en maltose obtenu par saccharification de l'amidon liquéfié ; cela ressort du
- 35 tableau III ci-après.

TABLEAU III

Enzymes ajoutés		Composition du sucre			
		glucose (%)	Maltose (%)	Malt-triose (%)	Dextrine (%)
40 E	Pullulanase $\beta$ -amylase	0.6	93.0	5.1	1.9
45 F	Pullulanase Isoamylase de Pseudomonas, $\beta$ -amylase	0.8	95.1	4.0	0.9

Nota : Dans chaque expérience on maintient une solution gélifiée contenant 2% d'amidon de patate douce avec la même quantité d'enzyme ; la quantité de pullulanase, utilisée en (E), est égale à la quantité des enzymes combinés employés en (F), c'est-à-dire pullulanase + isoamylase produite par des bactéries du genre *Pseudomonas* à 45°C pendant 64 heures. Le pH pendant la conversion est de 6,0 pour E et de 5,5 pour (F).

L'accroissement de la production de maltose, obtenu par l'utilisation combinée de différentes variétés d' $\alpha$ -1,6-glucosidases, peut être attribué aux différentes possibilités de clivage de la pullulanase et de l'isoamylase produite par les *Pseudomonas* vis-à-vis des différentes liaisons  $\alpha$ -1,6.

Dans une forme d'exécution perfectionnée de la présente invention le procédé, pour la production de solutions de maltose de grande pureté, comprend l'utilisation de  $\beta$ -amylase et d'une ou de plusieurs variétés différentes d' $\alpha$ -1,6-glucosidases ; une autre variante est caractérisée par l'emploi de  $\beta$ -amylase, d'une ou de plusieurs variétés différentes d' $\alpha$ -1,6-glucosidases et aussi d' $\alpha$ -amylase.

Le nouveau procédé comprend ainsi, au cours du stade de saccharification, l'application de  $\beta$ -amylase et d' $\alpha$ -1,6-glucosidases avec ou sans addition d' $\alpha$ -amylase.

L'invention permet la production simple et efficace de maltose de grande pureté avec un rendement élevé. Elle est décrite plus en détail ci-après. Le produit de départ utilisé dans ce procédé de saccharification peut être de l'empois d'amidon liquéfié à l'amylase, ou gélifié et liquéfié par chauffage.

A titre d'exemple, des essais furent effectués sur des bouillies contenant chacune 2% d'amidon de provenances différentes, dispersé et gélifié dans de l'eau bouillante, puis soumis à une température de 130°C sous pression pendant 5 minutes. Puis on y ajoutait 20 unités de pullulanase, 100 unités de  $\beta$ -amylase et 5 unités d' $\alpha$ -amylase par gramme d'amidon présent, et l'on saccharifiait le mélange pendant 16 heures à 45°C. Les résultats obtenus sont donnés au Tableau IV. Il est à remarquer que, si la bouillie est habituellement utilisée avec une concentration d'environ 2% en amidon, cette concentration peut dépasser 5% dans le cas de l'amidon de certaines céréales.

TABLEAU IV

Amidon de :	Degré d'amylolyse E.D. (%)	Pourcentage en sucres			
		Glucose	Maltose	Malt-triose	Dextrine
Patate douce .....	59.55	1.1	91.8	4.0	3.1
Maïs .....	59.97	1.7	92.3	4.3	1.7
Maïs visqueux .....	63.38	2.2	92.6	3.3	1.9

L'activité de l' $\alpha$ -amylase est déterminée selon la technique décrite en

11-12-la de la page 88 de "Analysis Methods of Starch Sugar Industry" édité par Society for Technical Research of Starch Sugars.

On liquéfie des bouillies d'amidon de concentrations différentes, préparées à partir d'amidon de patate douce, en utilisant de manière habituelle 5 l' $\alpha$ -amylase à température élevée, et en traitant sous pression à 130°C pendant 5 minutes (E.D. 10%). Puis, après addition de 25 unités de pullulanase et de 7 unités de  $\beta$ -amylase par gramme d'amidon, on saccharifie chaque mélange d'essai à pH 6,0 par chauffage à 45°C pendant 6 heures. Les résultats sont indiqués dans le tableau V. Dans ce procédé de 10 liquéfaction, il se révèle que la concentration appropriée de bouillie d'amidon est de 10% environ.

TABLEAU V

Conc. en amidon %	E.D. (%)	Composition en sucres (%)			
		Glucose	Maltose	Malt-triose	Dextrine
10	56.62	0.2	77.7	8.6	13.4
20	53.7	0.3	75.4	8.6	15.7

En outre, si l'on observe le rapport existant entre le degré de liquéfaction de l'amidon et la production de maltose, on constate, en regardant le Tableau VI, que le degré de liquéfaction est élevé plus 20 le B.D. l'est aussi, mais que plus l'E.D. est bas, meilleur est le rendement en maltose.

Il ressort de l'examen du tableau VII que la quantité de pullulanase à ajouter est de préférence de 20 unités environ par gramme d'amidon. Une addition trop importante exerce une action nocive sur la 25 saccharification par la  $\beta$ -amylase.

TABLEAU VI

E.D. % de l'ami- don liquide	E.D. Final (%)	Composition du sucre (%)			
		Glucose	Maltose	Malt-triose	Dextrine
3.8	53.69	0.6	82.0	6.7	10.7
11.8	54.86	0.9	75.0	13.8	10.3
18.8	55.16	1.1	68.5	21.0	9.4

Pour la saccharification, on suit le même mode opératoire que précédemment pour les essais du Tableau V, mais en utilisant 22 unités de pullulanase et 15 unités de  $\beta$ -amylase par gramme d'amidon. On utilise une 35 bouillie à 10% d'amidon de patate douce. Le degré de liquéfaction est de 2,5%, et la saccharification est effectuée à pH 5, 45°C pendant 36 heures.

TABLEAU VII

	Pullulanase	$\beta$ -amylase	E.D. Final (%)	Composition du sucre (%)			
				Glucose	Maltose	Malt-triose	Dextrine
40	10 unités	30 unités	55.8	0.8	85.4	6.3	7.5
	20 unités	30 unités	57.5	0.9	87.7	6.3	5.1
	200 unités	30 unités	58.9	1.0	92.0	13.5	
45	0	30 unités	58.9	1.1	69.6	3.5	25.7

Bien que la production de maltose augmente proportionnellement à la quantité de  $\beta$ -amylase ajoutée, il est préférable, du point de vue industriel, d'utiliser de 30 à 60 unités d'amylase par gramme d'amidon. La durée de saccharification est de 46 heures environ.

- 5 Lorsque l'on ajoute, par gramme d'amidon, 20 unités de pullulanase et 5 unités d' $\alpha$ -amylase, la suite du mode opératoire étant la même que pour le Tableau V, la saccharification des échantillons d'amidon liquéfiés obtenus donne les résultats rassemblés dans le Tableau VIII.

T A B L E A U VIII

10	Unités $\alpha$ -amylase par g d'amidon	Durée de Sacchari- fication	E.F. Final (%)	Composition du sucre (%)			
				Glucose	Maltose	Malt- triose	Dextrine
15	20	5	53.7	0.5	75.0	11.0	13.5
	"	12	57.6	2.2	78.9	12.2	6.7
	"	24	59.51	11.6	83.3	11.8	3.3
	"	46	60.0	1.4	82.5	13.1	3.0
20	60	6	55.5	1.1	79.6	9.0	10.3
	"	12	59.5	2.2	82.8	9.0	6.0
	"	24	611.3	2.0	87.1	8.4	2.5
	"	46	611.9	2.2	88.3	7.0	2.5

- La quantité d' $\alpha$ -amylase à ajouter au cours de la saccharification peut être faible, car elle ne doit servir qu'à la décomposition des dextrines restant. Habituellement il suffit pour cela d'une dose de 5 unités d' $\alpha$ -amylase par gramme d'amidon. Une addition trop importante peut nuire à la pureté du maltose. En ce qui concerne le moment à choisir pour cette addition, les données du Tableau IX indiquent que l'on obtient les meilleurs résultats, en l'effectuant durant la période intermédiaire de la saccharification. Il n'y a pas d'effet convenable, si l'addition est faite trop tard.

T A B L E A U IX

30	ADDITION d' $\alpha$ -AMYLASE	E.D. Final (%)	Composition du sucre (%)			
			Glucose	Maltose	Malt-triose	Dextrine
35	Témoin .....	62.82	11.4	87.3	9.1	2.2
	Après 6 heures..	62.80	2.2	87.3	7.4	3.1
	Après 12 " ..	62.80	1.3	88.2	7.1	3.4
	Après 24 " ..	62.90	1.4	89.8	5.9	2.9

- La vitesse de saccharification et la pureté du maltose obtenu varient avec la nature de l'amidon. L'amidon de maïs visqueux donne les meilleurs résultats, suivi, dans l'ordre, par l'amidon de céréale, l'amidon de patate et l'amidon soluble.

L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs qui suivent.

EXEMPLE 1

Dans 4500 ml d'eau bouillante, on ajoute 100 g d'amidon de céréale qui y est gélifié et dispersé. La dispersion aqueuse est ensuite portée à 130°C sous pression, pendant 5 minutes, refroidie à 45°C, et son pH est ajusté à 6. Après addition de 20 unités de pullulanase re-  
5 largable, et de 100 unités de  $\beta$ -amylase par gramme d'amidon, on saccharifie le mélange à 45°C pendant 48 heures. Puis, on chauffe la solution saccharifiée, la filtre, la concentre et la purifie par décoloration, à la manière habituelle. Après concentration à une teneur en eau de 15%,  
10 elle donne des cristaux incolores. L'analyse du produit sec montre qu'il s'agit d'un maltose de grande pureté comprenant 93% de maltose, 1,5% de glucose, 4% de malt-triose et 1,5% d'autres corps.

EXEMPLE 2

On ajoute 20 unités de pullulanase et 100 unités de  $\beta$ -amylase  
15 par gramme d'amidon, à 100g d'amidon de maïs visqueux, préalablement gélifié de la manière décrite dans l'exemple 1. On saccharifie le mélange à 45°C pendant 10 heures, et l'on ajoute ensuite 5 unités d' $\alpha$ -amylase par gramme d'amidon. La saccharification est reprise pour une durée de 45 heures supplémentaires. On fait bouillir le produit obtenu, le dé-  
20 colore, et le concentre. Une purification ultérieure avec de l'"Amberlite" IR 120, IRA68, et IRA 411 (désignations commerciales de résines échangeuses d'ions fabriquées par ROHM et HAAS Co.) suivie d'une concentration, donne un produit entièrement solide, ayant une teneur en eau de 13%. L'analyse indique que le produit sec contient 93,5% de maltose. En solution  
25 à 70%, il cristallise et des microcristaux se forment. Le fractionnement des cristaux donne du maltose à 96-97% de pureté.

EXEMPLE 3

On fait gélifier à la manière indiquée dans l'exemple 1, 100g d'amidon de maïs visqueux. Puis on ajoute par gramme d'amidon, 20 unités  
30 de pullulanase, 40 unités d' $\alpha$ -1,6-glucosidase, obtenue à partir d'une certaine variété de bactéries du genre Pseudomonas, et 25 unités de  $\beta$ -amylase. On ajuste le pH du mélange à 5,5, et ce dernier est saccharifié à 45°C pendant 46 heures, porté à ébullition, et ensuite purifié avec du charbon actif de manière habituelle, avant d'être concentré. Le  
35 sirop ainsi obtenu, qui contient 13% d'eau, cristallise immédiatement. L'analyse du produit sec indique que sa teneur en maltose est de 95%.

EXEMPLE 4

On prépare, à partir de 500 g d'amidon de patate douce, une bouillie contenant 30% environ d'amidon. Après addition de 0,2% de  
40 "Neospitase" (désignation commerciale d'une  $\alpha$ -amylase fabriquée par NAGASE SANGYO Co.), la bouillie à pH 6 est liquéfiée à 88°C. L'opération est arrêtée lorsqu'est atteint un E.D. de 2,7. On ajoute de l'eau chaude, pour former une solution à teneur en solide de 10%. Puis, on ajoute, par gramme d'amidon, 25 unités de pullulanase et 50 unités de  $\beta$ -amylase. A-  
45 près 15 heures de saccharification à pH 6 et 45°C, on ajoute à nouveau

5 unités de "Neospitase" par gramme d'amidon. La saccharification dure au total 48 heures. Le produit obtenu est chauffé, filtré et purifié avec du charbon actif et des résines échangeuses d'ions, de manière habituelle. Cette solution de maltose de grande pureté est concentrée à 5 une teneur en eau de 15%, et cristallisée. Le rendement en matière solide par rapport au solide de départ est de 92% ; la teneur en maltose, du produit sec, est de 94%.

10 Il est bien entendu que la description détaillée et les exemples particuliers indiquant des formes de réalisation préférées de l'invention, ne sont données qu'à titre d'illustration ; différents changements et modifications possibles apparaîtront à l'homme de l'art en partant de cette description détaillée, sans sortir du cadre de l'invention.

### R E S U M E

1. Procédé pour la production de maltose de grande pureté par liquéfaction de bouillies d'amidon, suivie de la saccharification par addition de  $\beta$ -amylase et d'une ou de plusieurs variétés d' $\alpha$ -1,6-glucosidases.

Le procédé peut, en outre, présenter une ou plusieurs des caractéristiques suivantes.

2. La liquéfaction est effectuée par l'action de la chaleur.
3. La liquéfaction s'opère sous l'effet d'un enzyme amylolytique, en particulier tel qu'amylase.
4. Le milieu est additionné d' $\alpha$ -amylase après la liquéfaction.
5. L' $\alpha$ -amylase suivant (4) est ajoutée pendant la saccharification.
6. La proportion de  $\beta$ -amylase employée pour la saccharification est de l'ordre de 10 à 100 unités par gramme d'amidon.
7. La proportion de glucosidase ajoutée avec la  $\beta$ -amylase est d'environ 10 à 50 unités par gramme d'amidon.
8. Les variétés de glucosidases utilisées sont telles que pullulanase, isoamylase de *Pseudomonas* ou/et autres.
9. L' $\alpha$ -amylase, ajoutée pendant la saccharification, est à la proportion de 5 à 60 unités par gramme d'amidon.
10. La liquéfaction ayant eu lieu à une température d'environ 80° à 130° C, on refroidit vers 40° à 50°C pour effectuer la saccharification après l'adjonction de  $\beta$ -amylase, de glucosidase et, éventuellement, d' $\alpha$ -amylase, à un pH de 5,5 à 6,5.
11. La saccharification est conduite sur un milieu liquide dont le degré d'amylolyse (E.D.) est d'environ 2 à 10.